

Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti
all'azione di basse temperature su uova ed
embrioni di *Rana esculenta* e *Bufo bufo* ⁽¹⁾

L'azione della temperatura sullo sviluppo embrionale è, da antica data, argomento di studio degli embriologi: sono nozioni ormai acquisite il più intenso ritmo di sviluppo e il più rapido raggiungimento di stadi avanzati ad una temperatura elevata nei confronti di quanto accade alle basse temperature. Le osservazioni e gli esperimenti compiuti su tale argomento sono perciò assai vari e numerosi.

In questa breve rassegna della letteratura dovrò quindi riferirmi soltanto ai contributi fondamentali e, principalmente, a quelli che riguardano gli effetti morfogenetici della temperatura in generale, e, in secondo luogo, a quelli relativi agli effetti citologici.

Dopo i primi e lontani lavori di FERÉ (1894) e di HERTWIG (1896, '98), che trattano della velocità di sviluppo delle uova e dell'accrescimento degli embrioni di Anfibi alle diverse temperature e dei limiti entro i quali si realizza un normale sviluppo, si incontrano le ricerche di SCHULTZE (1895, '99), di MORGAN (1895), CHIARUGI (1897), LILLIE e KNOWLTON (1898) che, per prime, illustrano le principali anomalie determinate dalle basse temperature sull'uovo degli Anfibi da poco fecondato. Così LILLIE e KNOWLTON osservarono che dei due emisferi, quello vegetativo era più colpito di quello animale e MORGAN in *Rana palustris* poté stabilire che quando una porzione dell'uovo è colpita, le altre parti non producono l'embrione di proporzioni più piccole, ma soltanto quelle strutture, quelle parti che da esse si sarebbero sviluppate nell'embrione intero. Ciò non significa che il materiale illeso non sia totipotente (si intende entro i limiti del differenziamento dei foglietti embrionali), ma che le interrelazioni tra parti lese e quelle normali e fin'anche la distribuzione di esse parti, sono tali da rendere possibile solo uno sviluppo parziale e non il « tutto » (T. H. MORGAN).

Per un certo periodo non mancarono i tentativi, ingegnosi, ma non del tutto validi, di ricondurre l'azione della temperatura ai principi della termo-chimica e

(1) Memoria presentata dall'Accademico Pasquale Pasquini.

di applicare ai fenomeni biologici le leggi ricavate dallo studio della chimica (KROGH, 1914; KANITZ, 1915; CROZIER, 1924; NEEDHAM, 1931, ecc.).

Di particolare interesse il lavoro del KROGH il quale riuscì a dimostrare, in *Rana*, che il rapporto temperatura-velocità di sviluppo era espresso da una linea retta anziché da una curva esponenziale, come era stato ritenuto da autori precedenti (HEERTWIG e altri) e che il rapporto temperatura-tempo veniva meglio espresso da una curva iperbolica anziché esponenziale; non illustrò peraltro, gli effetti morfogenetici.

Parecchi anni più tardi ATLAS (1935) poté stabilire, sperimentando su *Rana pipiens*, che il cambiamento di temperatura modifica il grado di sviluppo dell'embrione in maniera costante durante i vari stadi, esprimendo l'andamento del fenomeno con la seguente equazione: $\log V = f\left(\frac{1}{T}\right)$, dove V è la velocità di sviluppo e T la temperatura assoluta.

Un interesse particolare ai fini del presente lavoro presentano le ricerche sugli effetti morfogenetici-teratogenici di temperature elevate e basse, su differenti stadi dello sviluppo.

Per primo HOADLEY (1938) studiò gli effetti morfogenetici delle temperature sopramassimali⁽¹⁾ sui primi stadi dello sviluppo di *Rana pipiens*, rilevando: a) ritardo di chiusura del blastoporo; sul labbro dorsale di esso, si costituiva una piccola gemma caudale; b) chiusura atipica del blastoporo accompagnata da fuoriuscita di materiale vitellino e, in genere, anche da un certo grado di « microcefalia » associata ad arresto di sviluppo delle strutture midollari; assenza degli occhi e soppressione di vari organi ectodermici nella estrema regione cefalica; c) alterazioni di sviluppo del tubo neurale, dei segmenti muscolari, della notocorda e dell'intestino.

Nello stesso anno KNIGHT (1938), eseguì alcuni esperimenti su *Triton alpestris* e *Ambystoma punctatum* e osservò che il grado di sviluppo raggiunto a varie temperature da 7° a 33° C., confrontato con quello raggiunto alla temperatura normale, era direttamente proporzionale alla temperatura. Le temperature più elevate determinavano separazione dei blastomeri, alterazioni della pigmentazione e arresto di sviluppo; temperature più basse, invece, causavano anomalie di segmentazione, riduzione delle dimensioni dell'embrione e perdita di pigmento. Qualora poi gli embrioni fossero trasferiti dalla temperatura ambiente a temperature più basse, subivano un rallentamento dello sviluppo, più accentuato di quanto non si verificasse negli embrioni tenuti fin dall'inizio a basse temperature. Il movimento ciliare si iniziava, in ogni caso, dopo la chiusura delle pieghe neurali qualunque fosse stato il tempo trascorso per raggiungere quello stadio.

MOORE (1939) rilevò che in alcune specie di Anfibi (*Rana sylvatica*, *Rana pipiens*, *Rana palustris*, *Bufo americanus*, *Ambystoma maculatum*, ecc.) esiste un rapporto di interdipendenza « fra i limiti di temperatura tollerati, la velocità di sviluppo

⁽¹⁾ Riferisco questo dato bibliografico in quanto dimostra che gli effetti delle temperature elevate non di rado sono molto simili a quelli delle basse temperature.

delle uova, le abitudini riproduttive, e la distribuzione geografica». Osservò inoltre che gli Anfibî che si riproducono in ambienti più freddi, posseggono, rispetto alle forme che si riproducono in ambienti più caldi, un «coefficiente» di temperatura di sviluppo più basso, temperature massimali e minimali di sviluppo più basse, e uno sviluppo più rapido.

All'azione differenziale di differenti temperature fatte agire sui due emisferi o su due danti laterali dell'uovo o su uova orientate diversamente, sempre in diversi stadi, si sono interessati vari Autori, fra cui HUXLEY (1927), GILCHRIST (1928), CASTELNUOVO (1932) e DRURY (1941). Gli effetti si manifestano più o meno accentuati a seconda della direzione nella quale agisce il gradiente termico; in generale si ha una segmentazione più veloce ed uno sviluppo più accelerato nelle regioni dell'uovo sottoposte a temperature più elevate. Potevano insorgere anche anomalie più o meno vistose qualora notevole fosse la differenza fra la temperatura agente su una parte dell'uovo e quella della parte opposta, ma soprattutto qualora le due temperature raggiungessero i limiti sopramassimali e sottominimali. Ripetendo gli embrioni nelle condizioni dell'«optimum» di temperatura, non di rado potevano riprendere il corso normale del loro sviluppo e le anomalie scomparire.

Circa l'interpretazione di questi effetti da gradienti termici, influenzanti l'uovo nei primi stadi, le opinioni dei sopracitati Autori non sono del tutto concordi. Peraltro queste discordanze si debbono riferire al fatto che sia le esperienze compiute che i presupposti teorici erano un poco diversi.

GILCHRIST (loc. cit.) è dall'avviso che il «gradiente termico» (nei suoi esperimenti la differenza fra le due temperature era piuttosto piccola: appena 5° C per 50 ore), espressione di un gradiente metabolico, abbia la capacità di modificare il «physiological pattern» dell'uovo, mutando di conseguenza la posizione e la forma delle strutture embrionali. Dal canto suo la CASTELNUOVO, che riscontrò il manifestarsi delle più singolari e maggiori anomalie negli embrioni allo stadio di piastra neurale, e constatò spiccate differenze nella velocità di divisione cellulare fra parte raffreddata e parte riscaldata dell'uovo, è dell'avviso che, in concomitanza a differenze nell'attività metabolica delle due metà, i risultati debbono essere riferiti ad un alterato funzionamento del centro organizzatore, di cui il gradiente termico renderebbe manifesta la lateralità e la struttura regionale. Infine DRURY pensa che ogni cambiamento nelle capacità di sviluppo a carico dell'ectoderma presuntivo, isolato termicamente, (l'esperimento consisteva infatti nel sottoporre l'emisfero animale a temperatura ambiente e l'emisfero vegetativo a temperature di 4-5° C), debba attribuirsi prevalentemente alla fase metabolica (*metabolic age*) dell'ectoderma presuntivo.

TAMINI (1947), ripetendo esperimenti eseguiti molti anni prima da altri Autori, ha controllato l'andamento dello sviluppo di *Amblystoma tigrinum*, *Rana cacula* e *Hyla viridis*, in rapporto alle variazioni della temperatura. L'A. ha constatato che la velocità di sviluppo dell'*Axolotl* in relazione alla temperatura è quasi parallela a quella di *Rana* e che le anomalie più frequenti che accompagnano lo sviluppo delle uova di queste due specie a temperature superiori all'optimum sono: microcefalia, asintassia cefalica, raggrinzamento delle gastrule e idrope cardiaco. In *Hyla viridis* TAMINI, pur non avendo fissato il maximum di temperatura com-

patibile con uno sviluppo normale, ha però notato come le temperature elevate non determinano alcune anomalie di sviluppo.

Assai di recente ANCEL (1959) ha osservato che il raffreddamento temporaneo (2 giorni a temperatura 17-24 °C) dell'uovo di Pollo, durante l'incubazione, determina delle malformazioni (a carico soprattutto delle palpebre, degli arti, del becco), delle emorragie e degli edemi localizzati. ANCEL ha osservato inoltre che ogni malformazione si manifesta al suo massimo grado qualora l'embrione venga sottoposto a bassa temperatura ad uno stadio ben determinato: ad es. per ottenere l'atrofia del becco occorre trattare l'embrione dal 6° all'8° giorno.

Anche LOVTRUP (1959) ha osservato che le basse temperature impediscono in qualche modo l'utilizzazione dei grassi e modificano l'andamento della sintesi degli acidi nucleici durante l'embriogenesi degli Anfibi.

Gli effetti della temperatura sono stati studiati, soprattutto in questi ultimi anni, anche sul piano citologico.

Per quanto questo aspetto del problema non interessi direttamente la mia ricerca, nondimeno ricorderò che il freddo può determinare delle anomalie durante la mitosi e la meiosi, a carico soprattutto del fuso con conseguente formazione di figure mitotiche anormali ed irregolare distribuzione dei cromosomi (BLAIR, 1952). Può inoltre determinare la triploidia (FANKHAUSER, e GRIFFITHS, 1939), la tetraploidia (BARBER e CALLAN, 1943), il mosaicism (BOOK, 1943-45; COSTELLO e HENLEY, 1948-49), la poliploidia e infine anche la ginogenesi (ROSTAND, 1934), e la partenogenesi (PARMENTER, 1933-40).

Il meccanismo causale dei fatti sopra citati non è ancora chiaro e il pensiero degli Autori è discorde; su un solo punto sono tutti d'accordo, nel ritenere cioè, che non esiste una stretta e tanto meno necessaria correlazione fra aspetto morfologico e anomalie citologiche, poiché larve esternamente anormali si sono rivelate normalissime nella loro costituzione citologica e viceversa.

Ricorderò infine che fattori di malformazione sia morfologica che istologica possono essere, oltre che le basse temperature, anche altri agenti fisici e chimici: quali ad es. il caldo, i raggi ultravioletti, la centrifugazione, il cloruro di litio, il clorotone, ecc. ecc. Sulle «larve a litio» degli Anfibi e sulla genesi dei vari gradi malformativi ben note, e ormai classiche, le ricerche del COTRONI (1915-1919, ecc.), da cui scaturirono risultati fondamentali che dettero la verifica sperimentale della grande importanza delle funzioni cellulari nello sviluppo della forma.

Fin dal 1891 DARESTE osservò che «non c'è una relazione necessaria e costante fra condizione fisiologica o fisica e produzione di una certa modificazione dell'organismo» il che equivale a sostenere che vi è indipendenza fra le varietà delle malformazioni ottenute e la natura dell'agente teratogeno (LOMBARDINI, 1868; KAESTNER, 1895, ecc.).

Il LEHMANN (1937), che ha compiuto, più di recente, esperimenti sull'azione del cloruro di litio sullo sviluppo embrionale degli Anfibi, ritiene che gli effetti di questa sostanza sulla morfogenesi di un determinato organo, dipendono dalla «fase sensibile», cioè dalla capacità a reagire, del corrispondente abbozzo che è limitata ad un pe-

riodo specificamente caratteristico. Ad esempio: le anomalie che interessano il neurasse sono in stretto rapporto con il periodo di determinazione e insorgenza della piastra neurale, tra l'inizio e il completamento della gastrulazione ed è in questo periodo che l'azione dell'agente chimico (o fisico) perturbatore, si fa più attivamente sentire. Ciò non perché tale agente agisce elettivamente sulle cellule costituenti l'abbozzo in questione, ma perché le cellule comprese in tale territorio sono le più attive dell'embrione nello stadio considerato.

Questo mio lavoro (*), intrapreso qualche anno fa per suggerimento e sotto la guida del mio Maestro, il Prof. P. Pasquini, ha per iscopo di illustrare, comparativamente, le varie anomalie di sviluppo ottenute con l'azione di basse temperature su vari stadi embrionali delle due specie di Anfibi Anuri (*Rana esculenta* e *Bufo bufo*).

MATERIALE E METODO

Ho eseguito due serie di esperimenti: la prima su *Rana esculenta* e la seconda su *Bufo vulgaris*. Le uova, prelevate dalle vasche di allevamento in laboratorio, venivano trasferite in comuni cristallizzatori, tutti delle stesse dimensioni e contenenti acqua di fonte alla temperatura di 17-20° C e in seguito portate, per il trattamento a freddo, nell'apparecchio frigorifero, precedentemente registrato alle temperature volute: 0-1° C, 3-4° C per la *Rana esculenta*: 2° C, 4-6° C per il *Bufo vulgaris*.

Il numero delle uova e degli embrioni trattati variava da un minimo di 60 a un massimo di 100 per i diversi stadi considerati e la durata del trattamento da un minimo di 24 ore ad un massimo di 10 giorni. Gli embrioni in via di sviluppo dopo il trattamento a freddo, venivano osservati e protocollati al binocolare tutti i giorni, fino al momento della fissazione e gli stadi di sviluppo confrontati con quelli delle Tabelle di SHUMWAY (1940) e CAMBRÆ (1956) cercando di interpretare le malformazioni che via via si delineavano. Gli embrioni anomali venivano disegnati e fissati secondo le necessità in vari stadi di sviluppo e sempre insieme ad *embrioni di controllo*, i quali erano stati allevati in cristallizzatori delle stesse dimensioni di quelli degli embrioni trattati, in acqua di fonte, a temperatura ambientale che variava da 17° a 20°.

I fissativi usati furono il liquido di Zenker e il liquido di Bouin: il primo con una percentuale del 4-5% di acido acetico glaciale per gli embrioni ricchi ancora di materiale deutoplasmatico; il Bouin, anch'esso al 5% di acido acetico glaciale, fu adoperato per fissare le larvette. Gli embrioni, inclusi in paraffina, venivano tagliati in fette di 8-10 micron e le sezioni colorate con emallume Carazzi eosina e Mallory.

(*) Ricerca eseguita con l'aiuto di un contributo del C.N.R. attribuito per ricerche di Embriologia sperimentale all'Istituto di Anatomia comparata dell'Università di Bologna sotto la direzione di P. Pasquini e trasferito poi (1958) all'Istituto di Zoologia dell'Università di Roma.

PARTE SPERIMENTALE

I. — EFFETTI DELLE BASSE TEMPERATURE SULLO SVILUPPO DI *Rana esculenta*.

Temperatura di frigorifero = 3°-4° C; (0°-1° C);

Temperatura di laboratorio = 17°-20° C.

Sono stati trattati i seguenti stadi riferiti alle tavole cronologiche dello sviluppo di *Rana pipiens* secondo SHUMWAY.

- 1) Uova in segmentazione (2-4 e 16-32 blastomeri).
- 2) Blastule (std. 9).
- 3) Gastrule incipienti (std. 10).
- 4) Tappi vitellini (std. 12).
- 5) Neurule incipienti (std. 13).
- 6) Neurule avanzate (std. 15).
- 7) Bottoni codali (std. 17).

Il numero complessivo delle uova per ogni stadio, tranne che per il primo ed in parte per il secondo, era di 100, suddiviso in 5 lotti di 20 uova ciascuno, per i quali il tempo di permanenza in frigorifero variava da un minimo di 15 ad un massimo di 120 ore (Tab. I).

1) Uova in segmentazione: 2-4 e 16-32 blastomeri.

Dal primo stadio (2-4 blastomeri), 20 uova trattate per 15 ore a 3-4° C si sono sviluppate pressoché normalmente, con una mortalità del 25%. Le sole anomalie riscontrate erano date da una leggera asimmetria della testa e da una maggiore lunghezza del sifone anale.

Altre 20 uova trattate per 70 ore alla stessa temperatura sono morte tutte dopo 3 giorni di permanenza in acqua a temperatura di laboratorio; solo una parte aveva raggiunto lo stadio di gastrula, ma i movimenti della gastrulazione si presentavano inibiti, con exogastrulazione iniziale (30%).

Il lotto composto di uova a 16-32 blastomeri e trattato per 50 ore a 0-1° C ha avuto un destino del tutto simile.

2) Stadio di blastula.

Le blastule di un primo lotto, sottoposte ad una temperatura di 0-1° C per 50 ore hanno proseguito nel loro sviluppo fino allo stadio di tappo vitellino; a questo stadio sono però morte tutte. Un embrione soltanto raggiunse lo stadio di bottone codale; esso si presentava di dimensioni più piccole rispetto ai controlli, edematoso e acefalo; anch'esso però in seguito è morto.

All'esame di sezioni microscopiche in serie di 2 esemplari, fissati dopo qualche giorno di soggiorno in acqua di fonte a temperatura di laboratorio, allo stadio di

tappo vitellino incipiente, si nota che si sono compiuti prevalentemente i movimenti gastrulari a carico delle cellule della volta animale, ossia i movimenti di scorrimento superficiale, avvolgimento e rotazione, mentre al contrario i movimenti di approfondamento sono appena accennati.

La maggior parte delle blastule del secondo lotto, quelle trattate da 72 a 120 ore alla temperatura di 3-4° C, ha dimostrato un comportamento del tutto differente. La mortalità si è rivelata molto più bassa (30%), mentre il restante ha potuto raggiungere lo stadio di larveta natante. Si deve però osservare che buona parte delle larvette fissate sarebbero morte nel volgere di breve tempo, anche perché le malformazioni erano spesso così profonde (80%) da rendere assai problematico un ulteriore e definitivo differenziamento.

Nei primi giorni di sviluppo seguenti il trattamento col freddo non si osservano anomalie; soltanto in un secondo tempo le malformazioni assumevano un aspetto ben definito. Si osservavano così embrioni edematosi, più piccoli del normale, altri con la testa contorta e la coda stranamente ripiegata; altri infine apparentemente non ulteriormente progrediti nello sviluppo e meno pigmentati.

L'esame microscopico ha messo in evidenza una serie di alterazioni a carico dei diversi sistemi.

Nel nevrasso si osservano alterazioni a carico del cervello anteriore e medio, massicci e ridotti di volume, con ventricoli ridotti o addirittura virtuali. Il rombencefalo, invece, non si presenta notevolmente alterato, se si eccettuano numerose cellule libere nel IV ventricolo. Gli occhi sono costantemente alterati: talora sono solo ridotti di volume, sovente privi di cristallino, ovvero addirittura mancano del tutto o ne rimane solo un piccolo rudimento. Le otocisti invece si presentano normali. Il midollo spinale è sovente raddoppiato per un tratto più o meno lungo, in corrispondenza di analoghe duplicature della corda.

Quest'ultimo fatto si presenta particolarmente interessante, in quanto costituisce pressoché la regola in tutte le larvette sviluppate dai lotti trattati col freddo allo stadio di blastula e di gastrula incipiente (v. lotto successivo). Talora la duplicatura della corda è completa e si estende fino alla regione caudale; talora invece v'è solo un accenno di duplicatura, dato da un sepimento connettivale che suddivide la corda in due danti. Da osservare poi che, anteriormente, la corda è molto più sottile che non nei controlli. Le masse muscolari non presentano invece anomalie.

Gravi anomalie si riscontrano anche a carico degli archi branchiali, asimmetrici e contorti. La cavità peritoneale è molto ampia, piena di liquido e contenente numerose cellule libere, spesso identificabili in elementi sanguigni sparsi o raggruppati lungo le pareti del peritoneo. Anche i tubuli renali si presentano frequentemente dilatati, e l'intestino, ridotto di volume e di lunghezza, è spesso compresso contro la parete ventrale.

3) *Stadio di gastrula incipiente.*

Embrioni trattati per sole 24-48 ore alla temperatura di 3-4° C si sviluppano regolarmente; altri, invece, tenuti a questa temperatura per un periodo superiore (72, 94, 120 ore) si sviluppano con anomalie. In genere sono più piccoli, ripiegati su se stessi, edematosi, con pinna codale sfrangiata e sacco vitellino prominente.

Manca spesso l'approfondimento del tappo vitellino, fatto questo che ha inciso sulla percentuale di mortalità (20%). Gli embrioni superstiti sono stati fissati allo stadio di larvetta natante.

V'è da osservare in genere che la vitalità di queste larvette era piuttosto ridotta, e con tutta probabilità non avrebbero mai raggiunta la metamorfosi. Le cifre della mortalità si riferiscono alla media delle percentuali degli embrioni morti dei lotti trattati da 72 ore in avanti; vi è da notare, infatti, che per le prime 48 ore la temperatura di 3-4° C non ha dimostrato alcun effetto teratogeno né in questi stadi di sviluppo, né in quelli successivi.

Dall'esame microscopico si rileva anzitutto un fatto predominante e quasi costante: la duplicità della corda e del midollo spinale (87%). La duplicatura della corda comincia molto cefalicamente, a livello della parte anteriore del mielencefalo; il raddoppiamento midollare, invece, si inizia ad un livello un poco più caudale. In un unico caso si osserva una duplicatura iniziale sia del midollo spinale (in cui esistono due canali ependimali), sia della corda, che presenta, a tratti, dei sepimenti cellulari che, a guisa di tramezzi, si insinuano nell'interno.

Il cervello anteriore, pur presentandosi un po' ridotto rispetto ai controlli, non offre particolari anomalie; soltanto in qualche caso le cavità cerebrali sono più dilatate, al contrario di quello che si è visto negli embrioni trattati allo stadio di blastula.

Gli occhi sono più piccoli del normale, con cristallino talora inglobato nella cavità del vitreo; spesso si presentano ravvicinati verso la linea mediana (sinofthalmia iniziale).

Fortemente ritardato è lo sviluppo dell'intestino, che è sempre di dimensioni ridotte, rispetto ai controlli, e in qualche caso si presenta come una formazione massiccia, spostata in posizione eccentrica.

Per quanto riguarda la muscolatura, infine, essa non presenta modificazioni profonde, tutt'al più è ridotta di volume o in qualche caso disposta irregolarmente.

4) Stadio di tappo vitellino.

Le anomalie macroscopiche sono qui di gran lunga minori rispetto a quelle degli stadi precedenti e limitate anche soltanto agli embrioni rimasti per un periodo di tempo abbastanza lungo in frigorifero (72-120 ore). Le più frequenti sono la microcefalia e gli edemi nella parte postero-ventrale del capo dell'embrione.

La mortalità è stata piuttosto bassa (10%) e gli embrioni hanno raggiunto lo stadio di larvetta natante, stadio al quale sono stati poi fissati.

Ho notato anche una certa differenza nelle dimensioni delle larve, fatto questo frequente e quasi comune a tutti gli stadi da me sperimentati.

Dall'esame microscopico dei preparati risulta che in generale le pareti del cervello, quando questo non è massiccio, si sviluppano asimmetricamente mentre le cavità ventricolari sono pressoché normali.

Gli occhi, più piccoli dal lato in cui la parete del cervello è più sviluppata, sono ravvicinati al piano mediano mostrando così una certa tendenza alla sinofthalmia. Le otocisti sono dilatate e comprimono il cervello. La corda si presenta normale, però ingrossata rispetto ai controlli.

TABELLA I.
TABELLA MANSUNTIVA DEGLI ESPERIMENTI ESAGUITI SU *Zona celandae* E DEI RISULTATI OTTENUTI.

Stadio trattato	Numero delle uova o embrioni	Temperatura in C°	Ore di trattamento	Mortalità %	Anomalie
Uova in segmentazione 2-4 s. 2-4 s. 16-32 s.	20	3-4	15	25	lievi exogastrale } 30% circa exogastrale }
	20	3-4	70	100	
	20	0-1	50	100	
Blastula	20	0-1	50	100	gravi: 80%
	100	3-4	72-120	30	
Gastrula incipiente	100	3-4	72-120	20	gravi: 87%
Tappo vitellino	100	3-4	72-120	10	di notevole entità: 45%
Neurula incipiente	100	3-4	72-120	2-3	lievi: 10% circa
Neurula avanzata	100	3-4	72-120	2-3	lievi: 10% circa
Bottrone codale	100	3-4	72-120	2-3	lievi: 10% circa

La cavità cardiaca e pericardica ed i tubuli renali sono assai dilatati e contengono numerosi elementi sanguigni che si rinviengono anche nelle pareti del mesentero il quale circonda e sostiene in posizione dorsale un intestino ridotto e piuttosto massiccio.

In conclusione si può affermare che le anomalie morfologiche ed istologiche sopra descritte non modificano sostanzialmente il piano di organizzazione e la struttura fondamentale degli embrioni trattati a questo stadio; fa eccezione un solo embrione, con cervello anteriore massiccio senza cavità, mielencefalo privo di tela corioidea, fossette olfattorie ed occhi molto ravvicinati, intestino ridotto. 45% di anomalie notevoli.

5) *Stadi di neurula incipiente, avanzata e bottone codale.*

Questi tre stadi (i cui lotti sono stati sottoposti successivamente, come al solito, per 24, 48, 72, 120 ore alla temperatura di 3-4° C) non presentano né all'esame macroscopico, né a quello microscopico importanti malformazioni tranne un certo ritardo di sviluppo e riduzione, nei lotti trattati più a lungo col freddo, nelle dimensioni e nel numero delle anse intestinali.

La percentuale della mortalità oscilla intorno al 2-3%, e quella delle anomalie intorno al 10%.

II. — EFFETTI DELLE BASSE TEMPERATURE SULLO SVILUPPO DI *Bufo bufo*.

Nei miei esperimenti, fatti in varie riprese, sono stati trattati i seguenti stadi, riferiti alle tavole cronologiche dello sviluppo di *Bufo bufo* secondo CAMBAR.

a) *Uova in segmentazione* (2, 4, 8, 16, 32 o più blastomeri), rispettivamente per 49 ore e 7 giorni alla temperatura di 4-6° C;

b) *Blastula incipiente, gastrale incipienti ed avanzate* (stadi B I₇, B II₁, e B II₂ di CAMBAR) per 7 giorni alla temperatura di 4-6° C;

c) *Tappo vitellino avanzato, neurula incipiente e neurula avanzata* (stadi B II₄, C II₉, e C II₁₁ di CAMBAR) per 10 giorni alla temperatura di 2° C.

La temperatura dell'acqua di allevamento era quella dell'ambiente di laboratorio (17°-20° C, Tab. II).

a) *Uova in segmentazione.*

Tutti gli embrioni che si sono sviluppati dalle uova trattate allo stadio di 2 blastomeri sono morti precocemente. In particolare quelli del lotto trattato per 49 ore hanno raggiunto lo stadio di bottone codale allungato; gli altri, trattati per 7 giorni, lo stadio di neurula incipiente o poco avanzata. A frequenti fatti di exogastrolazione e di exovati si accompagnavano sempre fatti di sfaldamento e disgregazione cellulare superficiale, ai quali seguiva la morte. In generale gli embrioni presentavano con un ventre molto grosso o con la gemma codale rivolta verso l'alto.

Lo stadio a 4 blastomeri si è comportato press'a poco nella stessa maniera dello stadio a 2 blastomeri; sono però, in questo caso, sopravvissuti 5 embrioni, che hanno raggiunto lo stadio di larvetta natante, piccola, contorta, edematosa.

L'esame microscopico di questi girini ha dato i seguenti risultati: mancanza dell'apertura orale, la cui cavità appare ristretta con piccoli accenni di papille; le trabecole e le cartilagini del rostro sono ravvicinate e parzialmente fuse. Gli organi olfattori sono rappresentati da una massa irregolare neuro-epiteliale che si apre con una apertura alla sommità del capo.

Il telencefalo è impari, piccolo; dapprima massiccio, in seguito cavitato con stretto lume eccentrico. Una grossolana ripiegatura della volta indica con probabilità una parafisi molto sviluppata.

Diencefalo e mesencefalo hanno pure forma assai irregolare, vale a dire di un semplice tubo a parete molto spessa. Gli occhi rudimentali sono fusi medialmente.

Il romboencefalo si presenta di diametro assai inferiore alla norma con parte inferiore spessa e parte superiore assottigliata (tela corioidea).

Le otocisti sono piccole e apparentemente constano solo della porzione sacculare. In questo ultimo tratto cefalico manca sia la corda che la muscolatura. Per tutto il restante tratto il midollo spinale è molto stretto col lume eccentrico rivolto verso l'alto. È assente completamente la corda ed al suo posto si notano masse muscolari molto scarse nella parte più anteriore del tronco e più abbondanti verso la regione della coda.

Stadio di 8, 16, 32 blastomeri. Del lotto di uova trattate per 49 ore è sopravvissuto un solo superstita giunto allo stadio di bottone codale. Questo venne fissato non appena la sua vitalità si mostrava compromessa. L'esame al binoculare mise in evidenza microcefalia, sinoftalmia, infossamento sulla parte ventrale della regione cardiaca, probabile formazione anormale dell'opercolo ed una coda stranamente contorta.

L'esame delle sezioni ha dimostrato una apertura boccale più ristretta che di norma con scarso sviluppo dei dentini cornei. Gli organi olfattori sono rappresentati da uno strato epiteliale, riconoscibile come tale solo dalla struttura delle cellule e dalla loro disposizione, con una duplicità assai poco pronunciata (sinrinia).

Essi sono accompagnati da due formazioni neuroepiteliali pari, di dubbia interpretazione; molto probabilmente si tratta però di un epitelio olfattorio soprannumerario. Posteriormente a questo ha inizio un segmento di encefalo impari con ventricolo centrale che per la presenza, più caudalmente, di una formazione parafisaria, si deve interpretare come un telencefalo impari. Al di sotto di questo si può osservare, per molte sezioni, un occhio ciclopico mediano senza cristallino. Il diencefalo ed il mesencefalo sono piuttosto ridotti. Il lume ventricolare è in sezione circolare.

Il romboencefalo non presenta come di norma le due porzioni alari disposte simmetricamente a destra ed a sinistra, ma tutta la massa cellulare si trova concentrata nella linea mediana, sovrastata da una tela corioidea. In questo tratto dell'encefalo manca la corda per cui si rileva chiaramente la caratteristica della sostanza bianca verso il basso e della sostanza grigia raccolta verso il centro, tipica degli embrioni privi di corda. Al di sotto del romboencefalo si riconoscono due oto-

cisti fuse, posteriormente alle quali la corda compare dapprima unica e poi duplice e quindi scompare definitivamente sostituita da fusi cartilaginei.

Il neurasse, anch'esso semplice e poi duplice in corrispondenza della corda, si regolarizza, pur presentandosi massiccio e con un lume molto ridotto.

Le masse muscolari dei somiti sono dapprima raccolte verso la linea mediana ed è soltanto a livello degli ultimi tratti del romboencefalo che acquistano il loro aspetto normale. Gli organi splanncici e mesodermici ventrali si presentano ridotti di dimensione, ma non anormali nella struttura.

La mortalità del secondo lotto dello stesso stadio (8, 16, 32 blastomeri) è stata eccezionalmente più bassa, anche se la durata del trattamento fu di molto più lunga (7 giorni).

La mortalità, stabilita, infatti, come nei casi precedenti, in base al numero di embrioni che raggiungono lo stadio di larva natante o girino, ha raggiunto la percentuale del 75% e si è verificata soprattutto allo stadio di bottone codale.

Tutti gli embrioni che avevano raggiunto tale stadio presentavano la solita bolla edematosa nella regione posteroventrale.

Dopo 13 giorni a temperatura di laboratorio, ho fissato 2 girini, fra i sopravvissuti, che presentavano più degli altri notevoli malformazioni esterne.

L'osservazione microscopica ha fornito i seguenti dati: mancanza completa della corda nel primo dei due girini osservati. La zona cordale si presenta occupata da muscolatura raccolta in blocchi metamerici, ma impari.

Questa disposizione si nota bene nelle regioni più caudali del tronco e della coda, poiché nella regione anteriore del tronco la muscolatura è scarsa e disposta in modo irregolare. Inoltre manca completamente in questo embrione tutta la regione cefalica; poco dopo le prime sezioni si nota infatti il pronefro. Sono perciò assenti tutto l'encefalo e gli organi di senso connessi (organi olfattori, occhi).

A livello delle prime sezioni del pronefro si nota una vescicola irregolare di struttura neuro-epitelliale, di dubbia interpretazione; dopo un certo numero di sezioni compare una piccola masserella di sostanza bianca con qualche pirenoforo; dopo alcune altre sezioni compare finalmente il neurasse, di calibro assai piccolo con lume strettissimo.

Al lato sinistro si nota un'otocisti isolata, poco sviluppata, circondata dalla capsula cartilaginea.

Da rilevare anche che le fessure branchiali, pure anormali, sono presenti e così pure gli archi branchiali cartilaginei. Come sempre gli organi di derivazione endodermica si presentano ridotti. Nel secondo embrione ho notato in particolare modo una sorta di adoppiamento nella porzione più anteriore della corda. Di questa la parte sinistra più grossa e contorta si continua per tutta la lunghezza dell'embrione; la parte destra, più sottile, scompare dopo breve tratto.

L'encefalo è molto irregolare ed è nettamente diviso in due settori collegati insieme. La muscolatura è pure irregolare. Tutti gli altri girini, dopo 25 giorni, ancora vivi, presentano uno strozzamento nella parte ventrale della regione cardiaca riferibile ad una anormale formazione dell'opercolo.

L'esame microscopico non ha messo in evidenza anomalie degne di nota.



Fig. 1 - B.

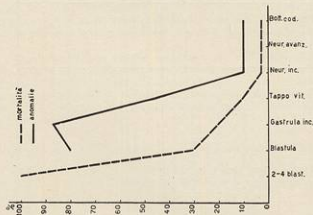


Fig. 1 - A.

Fig. 1 - Diagrammi illustranti l'andamento della mortalità e delle anomalie sia in *Equis esculentus* (A) che in *Bofo bofo* (B).
Sulle ordinate sono riportate le percentuali e sulle ascisse gli stadi di sviluppo.

TABELLA II
 TABELLA RIASSUNTIVA DEGLI ESPERIMENTI ESEGUITI SU *Bafo bafo* E DEI RISULTATI OTTENUTI.

Stadio trattato	Numero delle uova o embrioni	Temperatura in C°	Ore di trattamento	Mortalità %	Anomale
Uova in segmentazione : 2 blast.	50	4-6	40 7 giorni	100 100	
Uova in segmentazione : 4 blast.	50	4-6	40 7 giorni	90 100	gravi
Uova in segmentazione : 8, 16 32 blastomeri	50	4-6	40 7 giorni	98 75	gravi gravi
Uova in segmentazione : + 32 blast.	50	4-6	40 7 giorni	95 71	gravi gravi : 47%
Blastula incipiente	50	4-6	7 giorni	30	di notevole entità : 60%
Gastrula incipiente	50	4-6	7 giorni	16	lievi : 25%
Gastrula avanzata	50	4-6	7 giorni	6	lievi : 18%
Tappo vitellino avanzato	50	2	10 giorni	8	lievi : 11%
Neurula incipiente	50	2	10 giorni	5	lievi : 4%
Neurula avanzata	50	2	10 giorni	3	lievi : 3%

Uova ad oltre 32 blastomeri. Come nel precedente esperimento anche in questo si è verificato il paradosso della mortalità più alta nel lotto trattato per 49 ore (95%), nei confronti di quella registratasi nel lotto trattato per 7 giorni (71%).

In alcuni embrioni sopravvissuti (7 su 15) l'esame microscopico ha messo in evidenza interessantissime alterazioni di struttura, frequenti imparità delle trabecole, con anomalie degli organi olfattori i quali sono collegati da due piccolissime formazioni gangliari.

Nell'encefalo non sono riconoscibili le varie regioni perché la loro struttura è profondamente alterata. È assente la corda e le otocisti sono fuse, sulla linea mediana. Occhi, riconoscibili come tali, non si notano; è presente una particolare struttura in cui non si distinguono gli strati retinici, né il *tapetum* né il *cristallino*, ma che per la sua particolare disposizione potrebbe essere riferito ad un occhio rudimentale (ciclopico). Nella parte caudale la muscolatura è molto sviluppata mentre il midollo è sottilissimo.

L'intestino non presenta invece notevoli deficienze tranne una piccola riduzione; anche il rene è normale.

In tutti gli altri embrioni, che hanno raggiunto lo stadio di girino, alla mancanza di anomalie esterne corrisponde una normale struttura interna.

b) *Blastule incipienti.*

L'allevamento e l'osservazione a temperatura di laboratorio si sono protratti per 25 giorni durante i quali sono morti il 36% degli embrioni per lo più allo stadio di bottone codale.

Le anomalie visibili all'osservazione esterna, sono ridotte, da questo stadio in poi, ad edemi ventrali, ad una anormale chiusura delle pliche opercolari, al ritardo riassorbimento del sacco vitellino ed alla coda contorta e ricurva.

L'osservazione microscopica, invece, delle larve fissate allo stadio di girino natante ha rivelato che in alcuni di essi (9 su 15) il cervello è lievemente massiccio, gli occhi e le otocisti ravvicinate, assente la corda nella parte cefalica; inoltre il numero delle anse intestinali è ridotto rispetto a quello dei controlli.

Gastrule incipienti ed avanzate. Ambedue questi stadi hanno dato una percentuale di morti molto bassa (16% e 6%) e l'esame microscopico ha mostrato una struttura morfologica normale tranne che nell'encefalo dove non è raro osservare una riduzione del lume dei ventricoli con conseguente conformazione massiccia del cervello. Le percentuali delle anomalie oscillano intorno rispettivamente al 25 e al 18 per cento.

c) *Stadi di tappo vitellino avanzato, neurula incipiente e neurula avanzata.*

Gli embrioni di questi tre stadi sono stati trattati per 10 giorni alla temperatura di 2° C. La lunga permanenza in frigorifero non ha impedito alle uova di riprendere quasi normalmente il loro sviluppo.

Anche la mortalità è stata molto bassa (8, 5, 3%).

Le poche malformazioni osservate sulle sezioni interessano quasi esclusivamente il sistema nervoso nel quale la parte anteriore può presentarsi massiccia; gli organi di senso (olfattori ed occhi) tendono ad essere ravvicinati ed il midollo spinale possiede un lume piuttosto ridotto. La corda è normale e presente per tutta la sua lunghezza. La percentuale delle anomalie è rispettivamente dell'11, 4, 3%.

TABELLA III

COMPORAMENTO DELLA CORDA IN ALCUNI DEGLI STADI EMBRIONALI TRATTATI
CON LE BASSE TEMPERATURE IN *Rana esculenta* E IN *Bufo bufo*.

	4 blastomeri	8, 16, 32 blastomeri	Blastula	Gastrula incipiente	Tappo vitellino	Neurula
<i>Rana</i>			doppia	doppia	ingrossata	normale
<i>Bufo</i>	assente	assente o ridotta	ridotta	normale	normale	normale

DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI

Considerando nel loro complesso i risultati scaturiti dalle presenti osservazioni, mentre da un lato si conferma quanto già riscontrato dagli AA. precedenti nei confronti della diversa sensibilità al freddo dei vari stadi embrionali degli Anfibi, dall'altro si mettono in evidenza alcune interessanti particolarità di comportamento delle uova nelle due specie di Anuri considerate.

Per quanto riguarda i possibili effetti di differenti temperature, i risultati raggiunti sono troppo scarsi per poterne desumere qualche conclusione definitiva. D'altronde in esperimenti preliminari, premeva anzitutto stabilire quale temperatura riuscisse non letale per gli embrioni, e esercitasse contemporaneamente un effetto teratogenico apprezzabile; era necessario inoltre stabilire il tempo ottimale di esposizione a quella data temperatura.

Gli esperimenti hanno dimostrato, su stadi di sviluppo precoci, di uova in segmentazione, che temperature di 0-1° C per una durata di 50 ore, provocano una mortalità generale; che temperature di 3-4° C per 15 ore non sono teratogeniche; e infine che temperature di 3-4° C, fatte agire sopra gli stessi stadi per 70 e più ore, determinano effetti teratogenici apprezzabili. Per questo motivo ho scelto per i miei esperimenti una temperatura da 2 a 6° C, con tempo di esposizione da 70 ore a 7 giorni, riservandomi di approfondire successivamente i rapporti che intercorrono fra temperatura e tempo di esposizione.

Per quanto si riferisce alla diversa suscettibilità alla bassa temperatura dei vari stadi sottoposti all'esperimento, i risultati ottenuti confermano quanto già noto sulla elevata sensibilità dei primi stadi di sviluppo fino alla gastrulazione, e la sensibilità nulla o quasi degli stadi successivi, dalla fine della gastrulazione in poi, e dimostrano altresì un comportamento differente, come tipo e grado di anomalie riscontrate, della *Rana esculenta* rispetto a *Bufo vulgaris*.

Prescindendo da quelle alterazioni che hanno provocato la morte delle uova trattate, e sulle quali non è possibile fornire per ora una spiegazione, le basse temperature hanno agito inibendo o alterando il funzionamento del centro organizzatore, come può desumersi dallo studio dei derivati del territorio cordo-mesodermico e del neurasse nelle larvette anormali. Ma mentre in *Bufo* si sono verificati in prevalenza fenomeni di inibizione (assenza di tratti di corda, ciclopia, sinrinia, telencefalo impari), in *Rana esculenta*, accanto a fenomeni di questo tipo (che interessano il cervello anteriore e derivati) si sono potuti osservare effetti opposti, ossia duplicature più o meno estese della corda con corrispondenti raddoppiamenti del neurasse.

Non mi è possibile, purtroppo, per gli stadi della segmentazione, istituire un confronto fra *Rana* e *Bufo*, dati gli scarsi reperti disponibili in *Rana*; mentre in *Bufo* gli effetti del freddo su questi stadi si sono manifestati in molti casi con assenza di corda. Confrontando invece stadi corrispondenti delle due specie, di blastula e di gastrula, mentre in *Rana* si sono osservati costantemente casi di duplicature di corda e neurasse, in *Bufo* niente di simile si è potuto riscontrare. Comuni ad ambedue le specie sono soltanto fenomeni di inibizione di sviluppo in prevalenza a carico dell'organizzatore cefalico (per il cervello anteriore), più spiccati in *Rana*, principalmente negli esperimenti eseguiti allo stadio di blastula (occhi piccoli o assenti, telencefalo e diencefalo massicci), che non in *Bufo*, dove tali fenomeni sono assai meno accentuati.

Nelle larvette di *Rana esculenta*, da uova trattate allo stadio di blastula, si è potuto rilevare come il cervello anteriore e derivati siano parzialmente inibiti, il cervello posteriore pressoché normale, il midollo spinale e la corda raddoppiati; risulterebbe perciò un'inibizione nel funzionamento dell'organizzatore precordale ed una esaltazione del funzionamento dell'organizzatore spinale, ciò che nelle larvette di *Bufo* non si osserva.

Confrontando dunque gli effetti del freddo sulle uova delle due specie, *Rana esculenta* risulterebbe, nel complesso, più sensibile di *Bufo*; ciò che appare anche dal grafico della fig. 1, che vuole riassumere i dati ricavati dalle presenti osservazioni e dimostrare che, per stadi corrispondenti, in *Rana*, mortalità e grado di anomalie, sono più gravi che in *Bufo*. Questo fatto — in accordo con i risultati delle citate osservazioni di MOORE — potrebbe essere messo in relazione con le caratteristiche ecologiche delle due specie, giacché è noto che *Bufo vulgaris* depone le uova nella stagione ancor fredda, laddove *Rana esculenta* ha una deposizione stagionale più tardiva e perciò propria di acque a temperatura più elevata.

Analizzando ora, le varie anomalie riscontrate negli embrioni, ottenuti da uova sottoposte all'azione di basse temperature, ritengo che esse si possano raggruppare in due categorie: una che comprende difetti ed alterazioni superficiali

di singole regioni, essendo però normale l'organizzazione fondamentale dell'embrione; l'altra che comprende invece tutte quelle anomalie che hanno alterato più o meno profondamente il piano d'organizzazione dell'embrione o delle larve.

Nelle larve del primo gruppo non si sono riscontrate infatti anomalie di conformazione del neurasse, della corda, dei somiti, dell'intestino, ecc.; ma soltanto edemi localizzati nella regione ventrale, che possono successivamente essere più o meno riassorbiti, nonché lievi deformazioni della pinna caudale o del sifone branchiale ecc. Si tratta di lievi alterazioni generalizzate che non corrispondono a veri turbamenti della meccanica dello sviluppo dell'embrione.

Le anomalie che incidono invece profondamente sull'organizzazione dell'embrione, sono quelle che ho descritto nel corso del lavoro e che interessano prevalentemente i derivati dell'ectoderna e del mesoderma ed in piccola parte quelli dell'endoderma.

Fra gli organi di derivazione ectodermica sono soprattutto il neurasse e gli organi di senso cefalici a risentire dell'azione del freddo. L'encefalo, in qualche caso assente, può presentarsi ridotto di mole, contorto e massiccio, con le cavità ventricolari assenti o virtuali e, talora, con le pareti di un lato più sviluppate di quelle del lato opposto. Il midollo spinale può presentarsi duplice o ridotto in dimensioni o assente; gli organi di senso pari (fossette olfattorie, occhi ed otocisti) frequentemente più piccoli del normale, manifestano una tendenza a fondersi o almeno ad avvicinarsi sul piano mediano, altrimenti sono asimmetrici perché meno sviluppati da una delle due parti. Non sembra che il resto del territorio ectoblastico, da cui trae origine l'epidermide della parete del corpo, abbia risentito degli effetti delle basse temperature, sebbene non siano da escludere anomalie della divisione cellulare (della mitosi in particolare) che alcuni Autori (COSTELLO ed HENLEY) hanno già descritto.

Circa la genesi delle anomalie del sistema nervoso, che sono in tutto simili a quelle descritte da LEHMANN ed altri autori, sperimentando l'azione del litio sullo sviluppo degli Anfibi, si potrebbero invocare, anche se in via ipotetica, le stesse cause. Secondo tali Autori, il litio esplicherebbe un'azione inibitrice sullo sviluppo del mesoderma, alterando le attività induttrici del medesimo con conseguente anomalo sviluppo del neurasse cefalico e degli organi di senso ad esso strettamente associati. Una tale interpretazione tuttavia potrebbe valere soltanto nei casi in cui il mesoderma e suoi derivati, come effetto delle basse temperature, risultassero realmente alterati; ma nei casi ove la corda e i somiti sono pressoché normali, tale meccanismo non può essere chiamato in causa e soprattutto laddove si è potuto riscontrare un differente grado di sviluppo delle due metà dell'encefalo.

Fenomeni analoghi di asimmetria nel grado di sviluppo delle due metà dell'encefalo si sono potuti riscontrare, come è noto, sottoponendo le due metà dell'uovo a differenti temperature (GILCHRIST, CASTELNUOVO, DRURY). Ma negli attuali esperimenti è escluso che le uova, nella loro ganga gelatinosa, abbiano potuto subire gli effetti di un'azione differenziale della temperatura nei due opposti danti, e ciò tanto più in quanto gli stadi sottoposti all'esperimento variavano da uova in segmentazione a neurule avanzate. Resta inoltre sempre insoluita la questione del cervello ridotto o malformato in presenza di una corda e di somiti normalmente sviluppati.

Non è quindi possibile, per ora, fornire una spiegazione esauriente di questi fenomeni particolari, quali quelli dei due danti cerebrali asimmetricamente sviluppati e di un cervello anormale e ridotto in presenza di somiti e corda normali.

Per quello che riguarda l'insorgenza dei casi più comuni di anomalie a carico dei derivati ectodermici, io penso che la si debba soprattutto riferire all'azione del freddo sopra il metabolismo respiratorio. È noto infatti che nell'uovo degli Anfibi, fin dai primi stadi di sviluppo, le attività respiratorie sono distribuite secondo un gradiente, il cui più alto livello corrisponde al polo animale, quello più basso al polo vegetativo (FLIKINGER e BLOUNT, 1957). Non è da escludersi, perciò, che gli organi derivati dall'ectoderma, dal territorio situato nell'emisfero animale, come nerasse, organi di senso ecc. possano aver risentito dell'azione del freddo più degli altri derivati dal mesoderma e dall'endoderma, proprio perché negli stadi più precoci, quel territorio d'origine risulterebbe particolarmente influenzato nel suo metabolismo respiratorio.

Per quanto si riferisce alle anomalie che interessano i derivati mesodermici, cioè assenza, riduzione, duplicazione della corda, aumento e fusione sul piano mediano dei miotomi ecc., ritengo che in alcuni casi si possa parlare di una vera e propria « mesodermizzazione » (vedi risultati degli esperimenti su *Bufo*), nel senso usato da LEHMANN ed altri Autori, secondo i quali una parte o tutto il materiale formativo cordale si trasformerebbe in somiti; ma poiché questo fenomeno non si è verificato in entrambe le specie esaminate ma soltanto in qualche stadio di *Bufo*, se ne deve dedurre che esso possa essere legato a certe particolari condizioni per ora ignote. È probabile che anche in questo caso il metabolismo alterato giochi un ruolo importante, modificando il normale corso del differenziamento del mesoderma stesso.

Per quanto si riferisce alle anomalie a carico dei derivati endodermici, si osserva che esse si manifestano in modo particolare e prevalentemente con una notevole riduzione di volume del materiale vitellino e di conseguenza della lunghezza dell'intestino, che si presenta insieme ai suoi derivati (fegato, pancreas) meno sviluppato rispetto ai controlli e, non di rado, spostato dalla sua posizione normale. Queste anomalie sono più frequenti e vistose in *Rana* che non in *Bufo*.

È certo che parte delle cellule vitelline vanno incontro a sfaldamento, ma ciò non è sufficiente a spiegare la forte riduzione sopra rilevata. Ritengo in ogni caso che, oltre il fattore resistenza sia individuale che specifico, abbia una parte non indifferente negli effetti riscontrati sopra i derivati endodermici — come del resto su quelli ectodermici e mesodermici — lo stadio embrionale trattato.

Da quanto si è venuti esponendo emerge ancora che gli effetti del freddo sullo sviluppo embrionale ricordano in gran parte e molto da vicino quelli provocati da alcune sostanze chimiche (cloruro di litio, cloretone, ecc.) e da agenti fisici (raggi ultravioletti, raggi X, centrifugazione ecc.). Ciò, che è in piena armonia con quanto si conosce dell'azione aspecifica di questi vari agenti, mostra come non esista una stretta e necessaria relazione tra agente teratogeno e malformazioni che esso può determinare (DARESTE). Quel che conta, non è tanto chiamare in causa questo o quell'agente, ma saper cogliere il momento giusto o meglio la « fase sensibile » (LEHMANN) o la « fase di sensibilità teratogenica » (DARESTE), perché un dato ab-

bozzo reagisca sempre allo stesso modo, tenuto conto che la capacità a reagire è limitata ad un periodo caratteristico e specifico.

Siffatta interpretazione dei fenomeni si accorda pienamente con l'ipotesi avanzata da alcuni Autori (BRACHET, TAMINI, LØVTRUP, ecc.) secondo i quali la causa direttamente responsabile di molte anomalie di sviluppo sarebbe da ricondurre a inibizioni del metabolismo (quello glucidico in particolare secondo J. BRACHET, 1949). In tal modo sarebbe agevole comprendere perché sostanze chimiche od agenti diversi possano produrre effetti simili o identici. Tutti questi vari agenti, temperatura compresa, agirebbero sul metabolismo producendo degli effetti diversi a seconda del variare del « momento metabolico » e secondo il tipo di alterazione del metabolismo. Il « momento metabolico » sarebbe da omologarsi — essendone anzi l'espressione concreta — alla « fase sensibile » di LEHMANN o alla « fase di sensibilità teratogena » di DARESTE.

In conclusione :

Basse temperature (3-4° C su *Rana caeculenta*, 2-6° C su *Bufo bufo*) provocano in *Rana*, fino allo stadio di gastrula, e in *Bufo*, fino allo stadio di blastula, un'alta mortalità e gravi anomalie di sviluppo; da questi stadi in poi la mortalità si abbassa fino a valori minimi e le anomalie si riducono ad alterazioni di lieve entità.

Le anomalie più profonde interessano i derivati ectodermici (neurasse, organi di senso pari ecc.) e, con intensità gradualmente decrescente, i derivati mesodermici (corda, somiti, ecc.) e endodermici (intestino, fegato, pancreas).

Dal complesso dei risultati emerge anche con sufficiente chiarezza che la *Rana* è più sensibile del *Bufo* all'azione del freddo, e che in ambedue le specie le anomalie diminuiscono di intensità dalla testa alla coda e dal dorso verso il ventre.

Circa la genesi di tali anomalie, è probabile che il freddo agisca come inibitore del metabolismo, soprattutto respiratorio, con conseguente inibizione ed alterazione del funzionamento del centro organizzatore e del materiale induttore. La presenza di più gravi e numerose malformazioni a carico dei derivati dell'emisfero animale, sia ectodermici che cordo-mesodermici, potrebbe essere dovuta al fatto che il metabolismo respiratorio ha subito una inibizione più profonda là dove presenta il livello più alto, cioè al polo animale dell'uovo e che tale inibizione diminuisca col diminuire dello stesso tasso metabolico, con conseguente attenuazione dell'entità dell'anomalia.

BIBLIOGRAFIA

- ANCEL P., 1959, *Echecrhes sur les malformations dterminies par le refroidissement temporaire de l'oeuf de poule et compatible avec la vie des Poussins*. Journ. Embr. Exper. Morph., VII, p. 330.
- ATLAS M., 1935, *The effect of temperature on the development of Rana pipiens*. Physiol. Zool., VIII, p. 290.
- BARBER H.N. e CALLAN H.G., 1943, *The effects of cold and colchicine on mitosis in the newt*. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, CXXI, p. 238.
- BLAIR C.B., 1952, *The effects of temperature treatments on Triturus eggs as expressed in larval tail-tip epithelium*. Journ. Exper. Zool., CXX (2), p. 343.
- BOOK J.A., 1945, *Cytological studies in Triton*. Hereditas XXXI, p. 177.
- ID., 1943, *Low temperature and cleavage in Triton taeniatus*. Hereditas, XXIX, p. 195.
- BRACHEY J., 1949, *Les effets morphogntiques cytochimiques et biochimiques d'un choc thermique en stade gastrula chez les Amphibiens*. Commun. 3 mes. Journies Cytocembriol. Belge Neerland u. Brussel 1949, p. 50.
- CAMBAR R. e GIPLOUX J.D., 1956, *Table chronologique du dveloppement embryonnaire et larvaire du Crapaud commun: Bufo bufo L.* Bull. Biol. XC, p. 198.
- CASTELNUOVO G., 1932, *Azione differenziale della temperatura sulle uova di Axolotl*. Boll. Zol., III, p. 201.
- CHIARUOI G., 1897, *Il raffreddamento come causa di anomalia di sviluppo delle uova di Anfibii*. Spemimentale, 51, Firenze.
- COSTELLO D.P. e HENLEY C., 1948, *Mitotic abnormalities in tail-tips of Triturus torosus*. Anat. Rec., XCIX, p. 26.
- ID., e ID., 1949, *Heteroploidy in Triturus torosus. I) The incidence of variation in a natural population*. Proc. Amer. Phil. Sol., XCIII, p. 428.
- COTRONI G., 1915-1919, *Correlazioni e differenziazioni*, Note I, II, III, IV. Rend. R. Acc. Naz. Lincei voll. XXIV e XXVIII.
- CROZIER W.J., 1924, *On biological oxidation as a function of temperature*. Journ. Gen. Physiol., VII, p. 189.
- DAKESTE C., 1891, *Recherches sur la production artificielle de monstruosit*. Paris.
- DRURY M.F., 1941, *Thermal isolation of the animal hemisphere of the frog embryo. I) Development during isolation*. Journ. Exp. Zool., LXXXVIII (2), p. 219.
- FANKHAUSER G. e GRIFFITHS R.B., 1939, *Induction of triploidy in the newt, Triturus viridescens, by cold treatment of inseminated eggs*. Proc. Nat. Acad. Sc., XXV, p. 233.
- FÉRÉ C., 1894, *Note sur l'influence de la temperature sur l'incubation de l'oeuf de poule*. Journ. Anat. Physiol., XXX, p. 352.
- FLIKINGER R.A. e BLOUNT R.W., 1957, *The relation of natural and imposed electrical potentials and respiratory gradients to morphogenesis*. Journ. Cell. Comp. Physiol., L, p. 403.
- GILCHRIST F.G., 1928, *The effect of an horizontal temperature gradient on the development of the egg of the urodele, Triturus torosus*. Physiol. Zool., I, (2), p. 231.
- HEKRTWIG O., 1896, *Ueber den Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Entwicklung der Fro-scheier*. Akad. Wiss. Berlin.
- ID., 1898, *Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung von Rana fusca und foeculenta*. Arch. Mikr. Anat., LI.
- HOADLEY L., 1938, *The effect of supramaximum temperatures on the development of Rana pipiens*. Growth, II, p. 25.
- HUXLEY J.S., 1927, *The modifications of development by means of temperature gradients*. Arch. Entw. Mech. Bd., 112.
- KAESTNER S., 1895, *Ueber knstliche Kllterruhe von Hhneriern im Verlauf der Bebrtung*. Arch. Anat. Physiol. Anat. Abs., p. 319.
- KANTZ A., 1915, *Temperatur und Lebensvorgnge*, Borntrager, Berlin.

- KNIGHT F.C.E., 1928, *Die Entwicklung von Triton alpestris bei verschiedenen Temperaturen mit Normaltafel*, Roux Arch. Entwickl. Mech. Organ., CXXXVII (4), p. 461.
- KROGH A., 1914, *On the influence of the temperature on the rate of embryonic development*, Zeitsch. für Allg. Physiol., XVI, p. 163.
- LEHMANN F.E., 1937, *Mesodermisierung des presumptiven Chordamaterials durch Entwicklung von Lötumchlorid auf die Gastrula von Triton alpestris*, Arch. Entw. Mech., CXXXVI.
- LILLIE F.E. e KNOWLTON F.P., 1908, *On the effect of temperature on the development of animals*, Zool. Bull., I, p. 179.
- LÖVTEUF S., 1959, *Utilization of energy sources during Amphibian embryogenesis at low temperatures*, Journ. Exper. Zool., CXL, p. 383.
- Id., 1959, *Synthesis of desoxyribonucleic acid during Amphibian embryogenesis at different temperature*, Journ. Exper. Zool., CXL, p. 545.
- LOMBARDINI, 1868, *Intorno alla genesi delle forme organiche e irregolari negli Uccelli e nei Batrachidi*, Pisa.
- MOORE J.A., 1929, *Temperatures and rates of development in the eggs of Amphibia*, Ecology, XX, (4), p. 459.
- MORGAN T.H., 1905, *The relation between normal and abnormal development of the embryo of the Frog: VIII) as determined by injuries caused by a low temperature*, Arch. Entw. Mech. XIX, p. 570.
- NEEDHAM J., 1931, *Chemical Embryology*, Cambridge Univers., Press.
- PARMENTER C.L., 1933, *Haploid, diploid, triploid and tetraploid chromosomes number, and their origin in parthenogenetically developed larvae and frog of Rana pipiens and Rana palustris*, Journ. Exper. Zool., LXVI, p. 409.
- Id., 1940, *Chromosome numbers in Rana fusca parthenogenetically developed from eggs with known polar body and cleavage history*, Journ. Morph., LXVI, p. 241.
- ROSTAND J., 1934, *Gynogenèse du crapaud par refroidissement de l'oeuf*, C.R. Soc. Biol. Paris, CXV.
- SCHULZE O., 1895, *Ueber die Einwirkung niedriger Temperatur auf die Entwicklung des Frosches*, I. Abst. Abh., X, p. 291.
- SHUKWAY W., 1940, *Stages in the normal development of Rana pipiens: I) External form*, Anat. Rec., LXXVIII, p. 139.
- TAMINI E., 1947, *Effetti della temperatura sullo sviluppo di alcuni anfibi*, Ist. Lomb. di Scienze e Lett., LXXX (1).

RIASSUNTO

Uova ed embrioni di *Rana esculenta* e di *Bufo bufo* in diversi stadi dello sviluppo, sono stati sottoposti a temperature molto più basse di quelle alle quali si compie lo sviluppo normale.

Gli stadi trattati in *Rana*, con temperature di 3-4° C (e in pochissimi casi di 0-1° C) furono: uova in segmentazione (2, 4, 16, 32 blastomeri), blastula, gastrula incipiente, tappo vitellino, neurula incipiente, neurula avanzata e bottone codale; e in *Bufo*: uova in segmentazione (2, 4, 8, 16, 32 e più blastomeri), blastula incipiente, gastrula incipiente, gastrula avanzata, tappo vitellino avanzato, neurula incipiente e neurula avanzata.

Le basse temperature hanno provocato un'alta mortalità e anomalie di varia entità, prevalentemente a carico dei derivati ectomesodermici: nevrasse, organi olfattori, occhi, otocisti, corda e muscolatura e in minor grado a carico dei derivati endodermici: intestino, fegato e pancreas. Le percentuali di mortalità e di anomalie variano da stadio a stadio e, a parità di stadio, da specie a specie. Così in generale la mortalità è più accentuata e le anomalie più profonde negli stadi più precoci; e le uova di *Rana* sono più sensibili al freddo di quelle di *Bufo*. Questi dati sono riportati schematicamente nelle tabelle 1 e 2 e rappresentati graficamente nei Diagrammi della fig. 1.

Circa l'interpretazione dei risultati ben poco si può dire; è verosimile comunque che il freddo abbia agito alterando ed inibendo il funzionamento del territorio del centro organizzatore della regione cefalica. Le differenze fra *Rana* e *Bufo* — ben s'intende a parità di stadi di sviluppo — sono molto probabilmente in correlazione con la diversa ecologia delle due specie e indicano una maggiore resistenza del *Bufo* rispetto alla *Rana*.

RÉSUMÉ

Des œufs et des embryons de *Rana esculenta* et de *Bufo bufo*, se trouvant en différents stades de développement, ont été soumis à l'action de températures beaucoup plus basses que celles auxquelles se réalise le développement normal.

Les stades de *Rana* qui ont été traités à la température de 3-4° C (et en très peu de cas à la température de 0-1° C) sont: œufs en segmentation (2, 4, 16, 32 blastomères), blastula, gastrula initiale, bouchon vitellin, neurula initiale, neurula avancée et bourgeon caudal; et les stades de *Bufo*: œufs en segmentation (2, 4, 8, 16, 32 et plus blastomères), blastula initiale, gastrula avancée, bouchon vitellin avancé, neurula initiale et neurula avancée.

Le refroidissement a déterminé une forte mortalité et des anomalies de différente entité, surtout en dommage aux dérivés des organes ectomesodermiques: nevraxe, organes olfactoires, yeux, otocystes, chorde et muscles et en mineur degré, en dommage aux dérivés endodermiques: intestin, foie et pancréas.

Le pourcentage de mortalité et d'anomalies varie de stade en stade et, à parité de stade, d'espèce en espèce. Ainsi, en général, la mortalité est plus accentuée et les anomalies plus profondes dans les stades plus précoces ; et la *Rana* est plus sensible au froid que le *Bufo*.

Ces données sont reportées par des schèmes dans les tableaux 1 et 2 et sont représentées graphiquement dans les Diagrammes de la fig. 1.

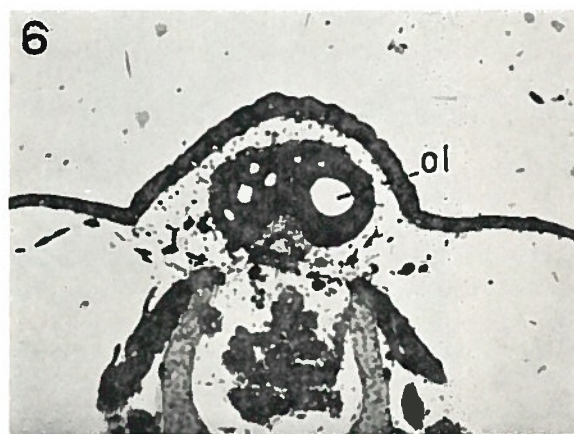
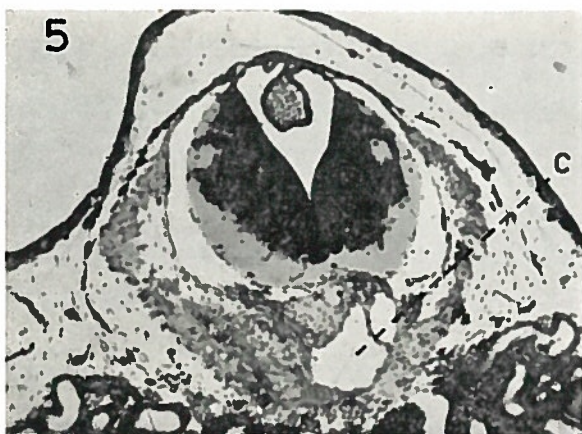
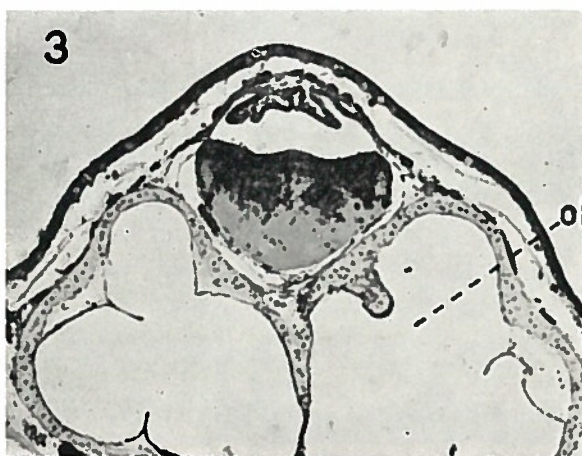
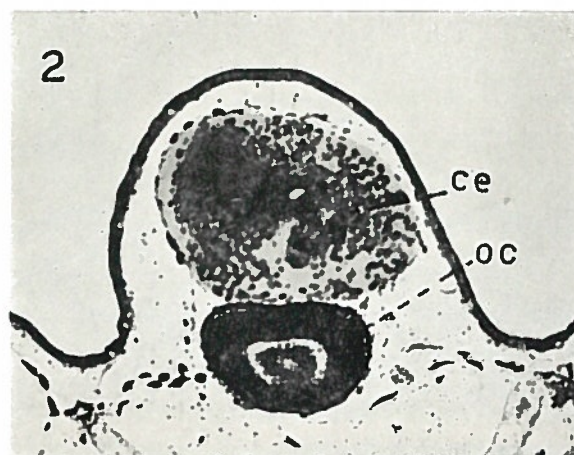
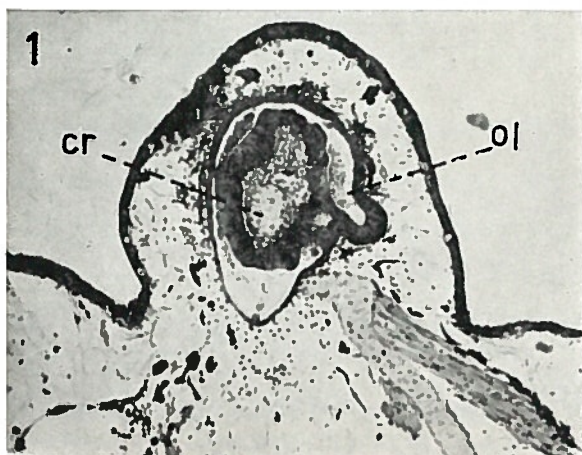
Quant à l'interprétation des résultats on peut dire très peu ; il est en tout cas vraisemblable que le froid ait agi en changeant et en inhibant le métabolisme respiratoire, en déterminant ainsi l'altération et l'inhibition du fonctionnement du territoire du centre organisateur de la région céphalique. Les différences entre *Rana* et *Bufo* — il va sans dire à parité de stade de développement — sont très probablement en corrélation avec la différente écologie des deux espèces et montrent une résistance plus grande en *Bufo* que en *Rana*.

ILLUSTRAZIONI

TAV. I.

FIG. 1 - Sezione trasversale, a livello degli organi olfattori, di un girino di *Bufo* da uova tenute alla temperatura di 4-6 C° allo stadio di 16 blastomeri. Gli organi olfattori (ol) sono stranamente malformati e parzialmente fusi, e circoscrivono una masserella di cartilagine (cr.). — FIG. 2 - Sezione trasversale dello stesso girino della foto 1, a livello un pozo più caudale; si osserva un cervello impari (ce) e massiccio, e sotto di esso un occhio (oc) impari, privo di cristallino. — FIG. 3 - Sezione trasversale dello stesso girino della foto 1, a livello del rombencefalo. Questo manca delle due porzioni alari, e le due otocisti (ot), dilatate più della norma, sono unite sul piano mediano. La corda è assente. — FIG. 4 e 5 - Sezioni trasversali dello stesso girino della foto 1, a livello degli ultimi tratti del rombencefalo; in 4 la corda (c) è assente e in 5 è presente; si noti come il neurasse si sia regolarizzato. — FIG. 6 - Sezione trasversale, fatta a livello degli organi olfattori, di un girino di *Bufo*, da uova trattate allo stadio di 2 blastomeri alla temperatura di 4-6 C°; gli organi olfattori (ol) si presentano come una massa neuroepiteliale, irregolare e fusa medialmente. — N.B. - Le fotografie di questa tavola, come anche tutte quelle delle tavole seguenti, sono state ingrandite, rispetto al vero, di circa 350 x.

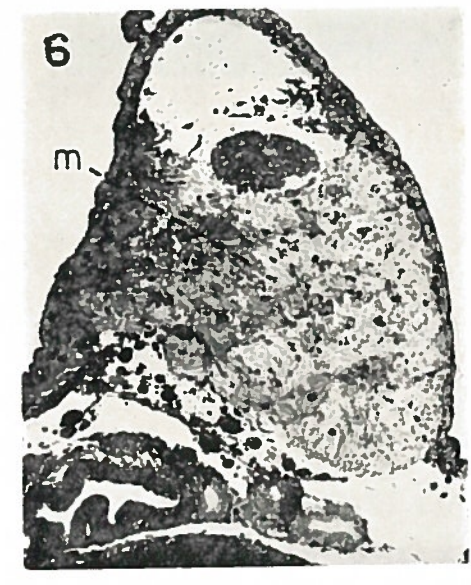
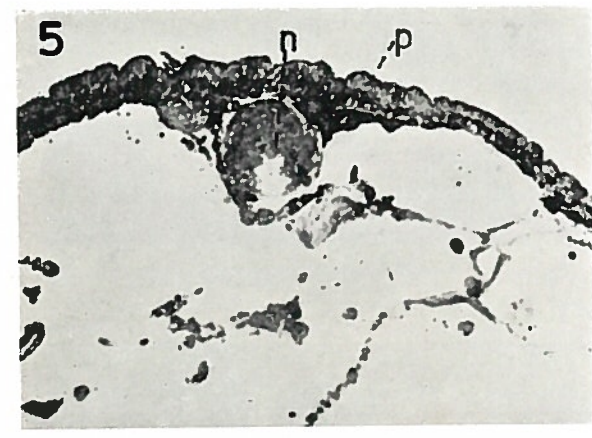
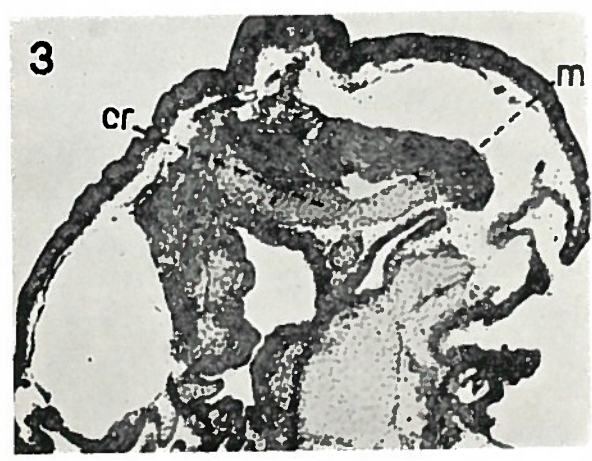
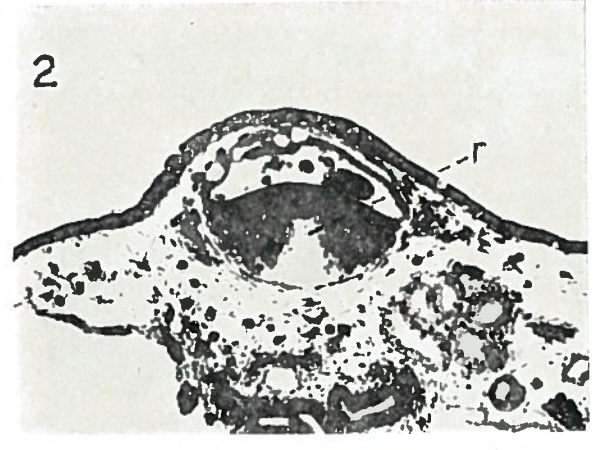
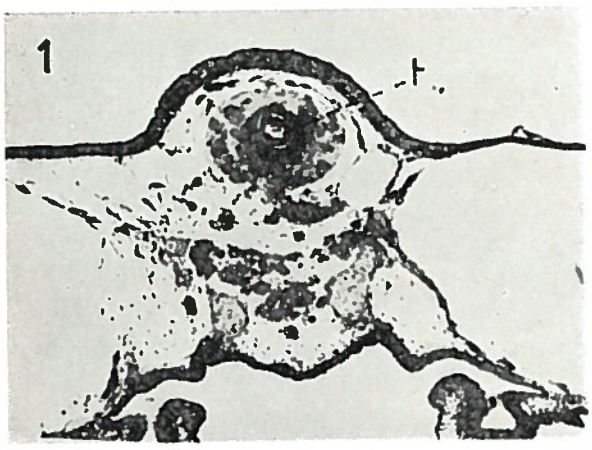
H. MANELLI - Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti alla azione di basse temperature su uova ed embrioni di *Rana esculenta* e *Bufo bufo*.



TAV. II.

FIG. 1 - Sezione trasversale, fatta a livello un poco più caudale, dello stesso girino di *Bufo* della foto 6 della tavola I. Il telencefalo (t) è impari, compatto, di ridotte dimensioni, con al centro un piccolo lume. — FIG. 2 - Sezione trasversale, a livello del rombencefalo, dello stesso girino della foto precedente. Il rombencefalo (r) è di dimensioni ridotte, ispessito nella parte inferiore; irregolare e vacuoloso superiormente; la corda è assente. — FIG. 3 - Sezione trasversale, a livello molto cefalico, di una larva di *Bufo*, da uova trattate allo stadio di 8-16 blastomeri alla temperatura di 4-6 C°; manca ogni traccia di sistema nervoso; assai irregolare conformazione delle cartilagini cefaliche trabecolari (cr) e della muscolatura (m). — FIG. 4 - La stessa larva della foto 3, tagliata trasversalmente a livello delle otocisti (ot) e delle prime sezioni del pronefro (p); fra le due otocisti si può osservare una piccola formazione irregolare di probabile natura nervosa; manca la corda. — FIG. 5 - La stessa larva della foto 3, tagliata ad un livello più caudale: il nevrasso (n) si presenta come una massa compatta, rotondeggiante e di dimensioni ridotte; di fianco e sopra il nevrasso qualche tubulo pronefrico (p); la corda è assente. — FIG. 6 - Sezione trasversale, a livello più caudale, della stessa larva della foto 3; manca la corda e la muscolatura (m) occupa quasi tutto lo spazio compreso fra le due pareti epidermiche.

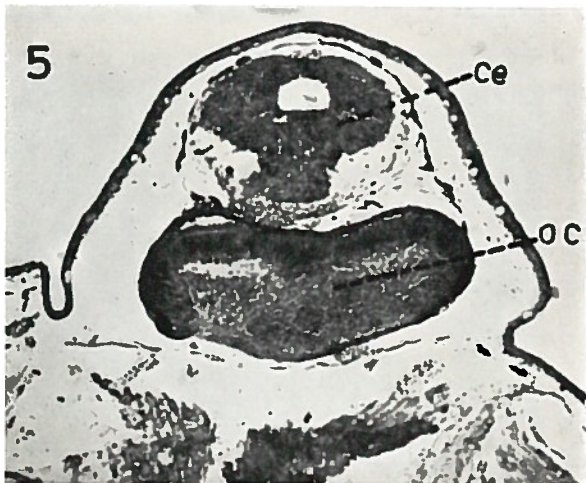
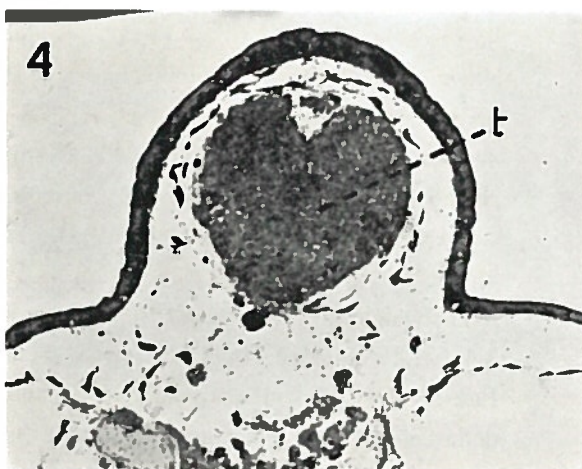
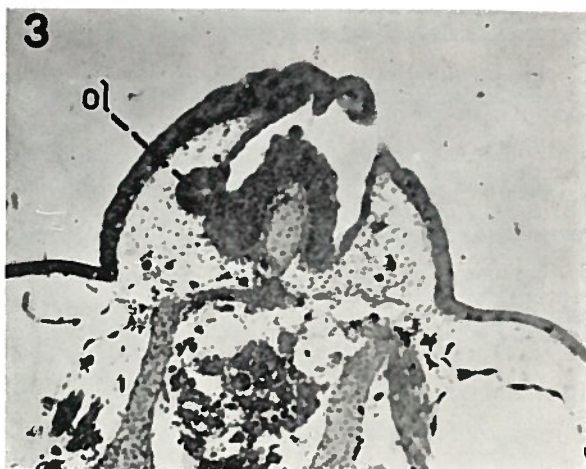
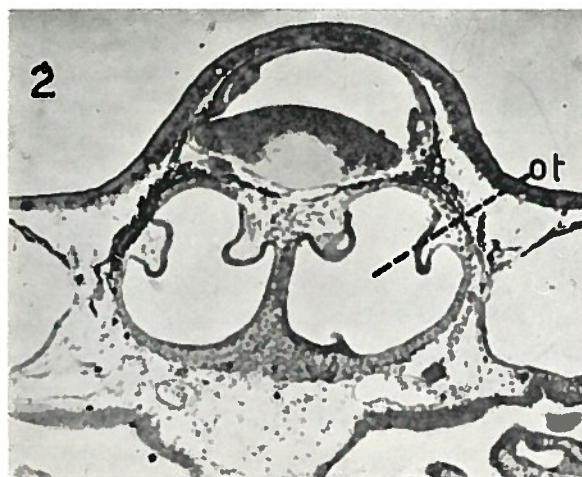
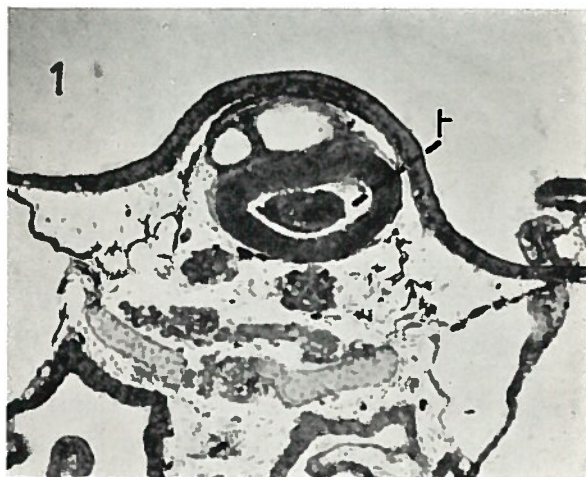
H. MANELLI - Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti alla azione di basse temperature su uova ed embrioni di Rana esculenta e Bufo bufo.



TAV. III.

FIG. 1 - Sezione trasversale cefalica di una larva di *Bufo*, da uova trattate con temperatura di 4,6 C°, allo stadio di oltre 32 blastomeri; il telencefalo (t) è impari e di anomala conformazione. — FIG. 2 - La stessa larva della foto 1, tagliata trasversalmente a livello del rombencefalo; notare la mancanza della corda e la unione mediana delle due otocisti (ot). — FIG. 3 - Sezione trasversale, a livello dell'organo olfattorio, di una larva di *Bufo*, da uova trattate ad oltre 32 blastomeri con temperatura di 4-6 C°; le fossette olfattorie (ol), di cui è meglio visibile quella di sinistra, sono comunicanti fra loro e con l'esterno con un'unica apertura laterale. — FIG. 4 - Sezione della stessa larva della foto 3, a livello un poco più caudale; il telencefalo è impari e massiccio (t). — FIG. 5 - Sezione trasversale, a livello degli occhi, di una larva di *Bufo*, da uova tenute alla temperatura di 4-6 C° allo stadio di gastrula avanzata; il cervello (ce) è anormale, provvisto di lume, ma simmetrico; sotto il cervello gli occhi (oc) sono fusi e mancano di cristallino.

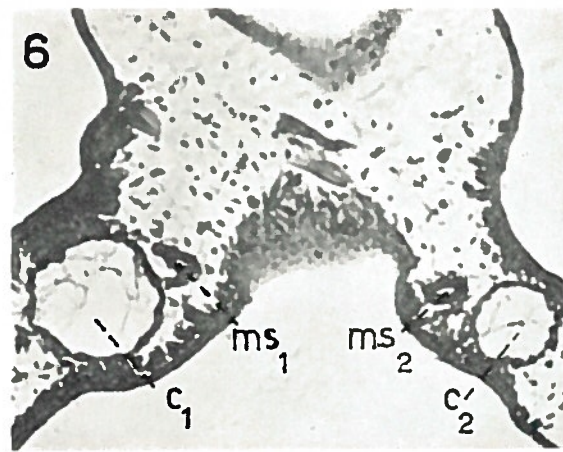
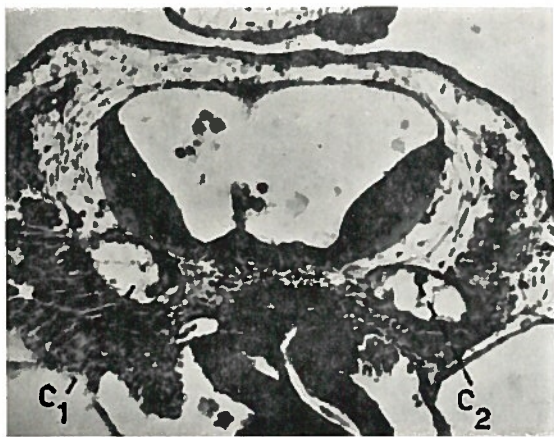
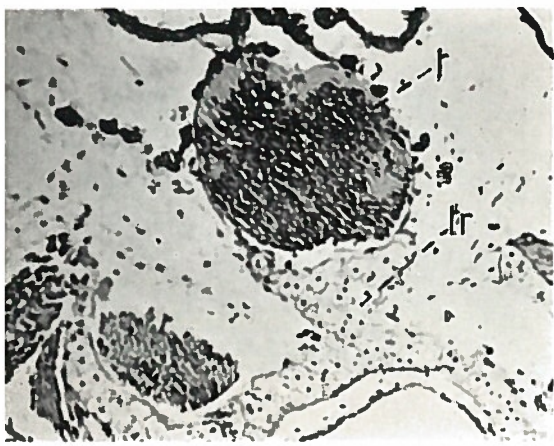
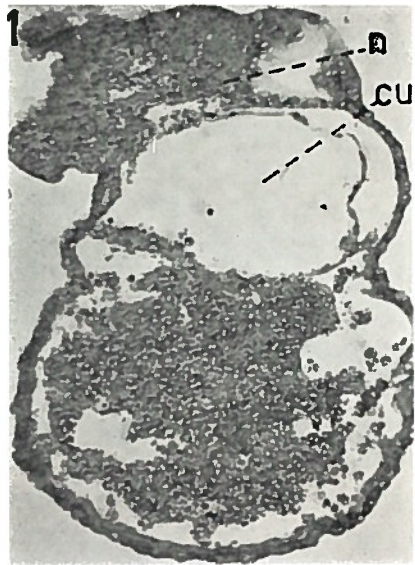
H. MANELLI - Di atecnie anomalic di sviluppo conseguenti alla azione di basse temperature su uova ed embrioni di Rana esculenta e Bufo bufo.



TAV. IV.

FIG. 1 - Sezione trasversale obliqua di un embrione di *Rana* sottoposto allo stadio di neurula alla temperatura di 3-4 C°; il sistema nervoso (n) è ridotto ad un ammasso informe appena distinguibile; al di sotto si nota una vescicola endoteliale dilatata, riconducibile verosimilmente all'endotelio cardiaco dilatato (cu). — FIG. 2 - Sezione trasversale cefalica di un girino di *Rana*, sottoposto allo stadio di neurula alla temperatura di 3-4 C°; gli organi olfattori (ol) sono ravvicinati e comprendono un bastoncino cartilagineo, che rappresenta probabilmente l'unica trabecola impari (tr). — FIG. 3 - Sezione trasversale dello stesso girino della foto precedente; il telencefalo è impari e ridotto di dimensioni (t); anche la trabecola è sempre unica (tr.). — FIG. 4 - Sezione trasversale dello stesso girino della foto 2, a livello degli occhi; questi sono ravvicinati medialmente, ridotti e con lente inglobata nello spazio del vitreo (oc.). — FIG. 5 - Sezione trasversale, a livello dell'ultimo tratto del rombencefalo, di un girino di *Rana*, da uova sottoposte allo stadio di gastrula alla temperatura di 3-4 C°. La corda è doppia (c₁, c₂) ed il nevrasso manifesta un primo cenno di duplicatura. — FIG. 6 - Lo stesso girino della foto 5, tagliato trasversalmente a livello caudale; alla duplicatura della corda (c₁, c₂) e del midollo spinale (m₁, m₂) corrisponde la duplicatura della coda.

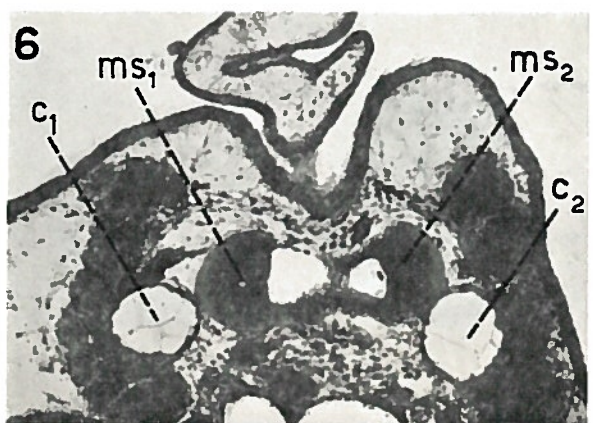
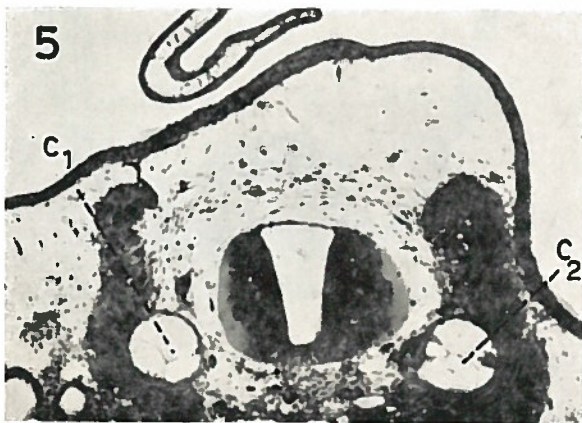
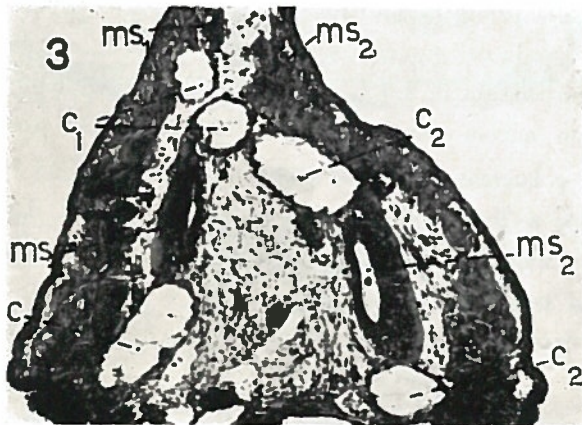
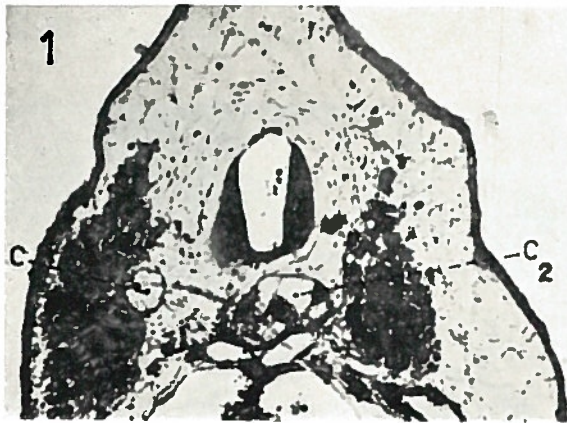
H. MANELLI - Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti alla azione di basse temperature sui uova ed embrioni di Rana esculenta e Bufo bufo.



TAV. V.

FIG. 1, 2, 3 - Sezioni trasversali di un girino di *Rana*, da uova sottoposte allo stadio di gastrula alla temperatura di 3-4 C°, a diversi livelli del midollo spinale. 1 = sezione all'inizio del midollo: la corda è duplice (c_1 , c_2) e il midollo è ancora unico; 2 = sezione a livello del tronco: il midollo spinale è già duplice (ms_1 , ms_2) e quello di destra possiede un lume molto ampio; 3 = sezione a livello caudale: di corde e di midolli ne appaiono quattro, perchè la coda è piegata su se stessa e il taglio attraversa esattamente il primo tratto della ripiegatura. — FIG. 4 - Sezione trasversale, a livello del rombencefalo, di un girino di *Rana*, da uova sottoposte allo stadio di blastula alla temperatura di 3-4 C°; i due danti del rombencefalo (r) si sono sviluppati asimmetricamente: quello di destra è molto più spesso. A lato del rombencefalo si vede una otocisti (ot). — FIG. 5 e 6 - Sezioni trasversali a livello dell'ultimo tratto del mielencefalo, di un girino di *Rana*, da uova trattate allo stadio di blastula con temperatura di 3-4 C°; in 5 la corda è doppia e il midollo unico; in 6 alla duplicità della corda (c_1 , c_2) si accompagna una quasi completa duplicatura (ms_1 , ms_2) del midollo.

H. MANELLI - Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti alla azione di basse temperature su uova ed embrioni di Rana esculenta e Bufo bufo.



TAV. VI.

FIG. 1 - Sezione trasversale, a livello dell'ultimo tratto del pronefro, di un girino di *Rana*, da uova sottoposte allo stadio di neurula incipiente alla temperatura di 3-4 C°; i tubuli pronefrici (p) sono un poco dilatati; il lume dell'intestino (in), anch'esso dilatato, contiene una masserella di materiale vitellino (v); addossato strettamente alla parete intestinale, si può osservare il pancreas (ps). — FIG. 2 - Sezione trasversale obliqua, a livello del pronefro, di un girino di *Rana*, da uova trattate allo stadio di gastrula incipiente colla temperatura di 3-4 C°; la cavità peritoneale (c.p.) è molto dilatata; l'intestino (in) e il fegato (f), non ancora completamente differenziati, sono compressi rispettivamente contro le pareti ventrale e laterale del corpo; anche i tubuli pronefrici (p) sono compressi lateralmente. — FIG. 3 - Sezione a livello più caudale dello stesso caso della foto 2. — FIG. 4 - Sezione trasversale, a livello immediatamente posteriore al pronefro, di un girino di *Rana*, da uova sottoposte allo stadio di tappo vitellino alla temperatura di 3-4 C°; l'intestino (in), ridotto ad una sola ansa, è poco differenziato e contiene nel suo lume cellule di sfaldamento.

H. MANELLI - Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti alla azione di basse temperature su uova ed embrioni di Rana esculenta e Bufo bufo.

